

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07D 487/22, A61K 49/00</p>		<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/05235</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Februar 2000 (03.02.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05522</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juli 1999 (15.07.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 35 082.1 24. Juli 1998 (24.07.98) DE</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>	
<p>(71) Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13342 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder: PLATZEK, Johannes; Grottkauer Strasse 55, D-12621 Berlin (DE). NIEDBALLA, Ulrich; Goßlerstrasse 28 a, D-14195 Berlin (DE). RADÜCHEL, Bernd; Golianczstrasse 132, D-13465 Berlin (DE). WEINMANN, Hanns-Joachim; Westhofener Weg 23, D-14129 Berlin (DE). FRENZEL, Thomas; Paul-Schneider-Strasse 41, D-12247 Berlin (DE). MISSELWITZ, Bernd; Metzer Strasse 4, D-16548 Glienicke (DE). EBERT, Wolfgang; Ernst-Thälmann-Platz 2, D-15831 Mahlow (DE).</p>		<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: PARAMAGNETIC 3-,8-SUBSTITUTED DEUTEROPORPHYRIN DERIVATIVES, PHARMACEUTICAL PREPARATIONS CONTAINING SAME, METHOD FOR PRODUCING SAME AND THEIR USE IN MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF NECROSIS AND INFARCTION</p> <p>(54) Bezeichnung: PARAMAGNETISCHE 3-,8-SUBSTITUIERTE DEUTEROPORPHYRINDERivate, DIESE ENHALTENDE PHARMAZEUTISCHE MITTEL, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG FÜR DAS NEKROSE- UND INFARKT-MR-IMAGING</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to paramagnetic 3-,8-substituted deuteroporphyrin derivatives having different substituents in positions 13 and 17 of the porphyrin skeleton, diagnostic substances containing said compounds, their use in magnetic resonance imaging of necrosis and infarction and methods for producing said compounds and substances.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft paramagnetische 3-,8-substituierte Deuteroporphyrinderivate mit verschiedenen Substituenten in den Positionen 13 und 17 des Porphyringerüstes, diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel, ihre Verwendung für das Nekrose- und Infarkt-MR-Imaging sowie Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen und Mittel.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Paramagnetische 3-, 8-substituierte Deuteroporphyrinderivate, diese enthaltende pharmazeutische Mittel, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung für das Nekrose- und Infarkt-MR-Imaging

5

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, das heißt paramagnetische 3-, 8-substituierte Deuteroporphyrinderivate, diese enthaltende pharmazeutische Mittel, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung für das Nekrose- und Infarkt-MR-Imaging

10

Detektion, Lokalisierung und Überwachung von Nekrosen oder Infarkten ist ein wichtiger Bereich in der Medizin. So ist der Myokardinfarkt nicht ein stationärer Vorgang, sondern ein dynamischer Prozess, der sich über einen längeren Zeitraum - Wochen bis Monaten – erstreckt. Der Infarkt verläuft in Phasen, die nicht scharf voneinander getrennt, sondern überlappend sind. Die erste Phase, die Entwicklung des Myokardinfarktes, umfaßt die 24 Stunden nach dem Infarkt, in denen die Zerstörung sich wie eine Welle vom Subendocard zum Myocard ausbreitet. Die zweite Phase, der bereits bestehende Infarkt, umfaßt die Stabilisierung des Bereiches, in dem Faserbildung (Fibrose) als Heilprozess erfolgt. Die dritte Phase, der ausgeheilte Infarkt, beginnt, nachdem alles zerstörte Gewebe durch fibröses Narbengewebe ersetzt ist. In dieser Periode findet eine umfangreiche Restrukturierung statt.

Bis heute ist kein präzises und zuverlässiges Verfahren bekannt, das die aktuelle Phase eines Myokardinfarktes am lebenden Patienten bestimmbar macht. Für die Beurteilung eines Myocardinfarktes ist es von entscheidender Bedeutung zu wissen, wie groß der Anteil des bei dem Infarkt untergegangenen (verlorenen) Gewebes ist und an welcher Stelle der Verlust erfolgte, denn von dieser Kenntnis hängt die Art der Therapie ab. Infarkte erfolgen nicht nur im Myokard, sondern auch in anderen Geweben, besonders jedoch im Hirn.

30

Während der Infarkt in gewissem Umfang heilbar ist, können bei einer Nekrose, dem lokal begrenzten Gewebetod, nur die schädlichen Folgen für den Restorganismus

verhindert oder wenigstens gemildert werden. Nekrosen können auf vielfache Weise entstehen: durch Verletzungen, Chemikalien, Sauerstoffdefizit oder Strahlung.

Wie beim Infarkt ist die Kenntnis von Umfang und Art einer Nekrose wichtig für das

5 weitere ärztliche Vorgehen. Schon früh erfolgten daher Versuche, Detektion und Lokalisation von Infarkten und Nekrosen durch Einsatz von Kontrastmitteln bei nichtinvasiven Verfahren wie Szintigraphie oder MRI zu verbessern. In der Literatur nehmen die Versuche, Porphyrine für das Nekroseimaging einzusetzen, einen großen Raum ein. Die erzielten Resultate ergeben jedoch ein widersprüchliches Bild.

10 So beschreiben Winkelman und Hayes in Nature, 200, 903 (1967), daß sich Mn-5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatophenyl)-porphyrin (TPPS) selektiv im nekrotischen Teil eines Tumors anreichert. Lyon et al., Magn. Res. Med. 4, 24 (1987) dagegen beobachteten, daß sich Mn-TPPS im Körper verteilt, und zwar in Niere, Leber, Tumor und nur zu einem geringen Teil in den Muskeln. Interessant ist dabei, daß die

15 Konzentration im Tumor erst am 4. Tag ihr Maximum erreicht und das auch nur, nachdem die Autoren die Dosis auf 0,2 mmol/kg gesteigert hatten. Die Autoren sprechen daher auch von einer offenbar nichtspezifischen Aufnahme des TPPS in den Tumor.

Bockhorst et al., wiederum berichten in Acta Neurochir. 1994 [Suppl.] 60, 347, daß

20 MnTPPS selektiv an Tumorzellen bindet. Foster et al., J. Nucl. Med. 26, 756 (1985), ihrerseits fanden, daß sich In-111 5,10,15,20-Tetrakis (4-N-methyl-pyridinium)-porphyrin (TlMPyP) nicht im nekrotischen Teil, sondern in den lebenden Randschichten anreichert.

25 Daraus zu folgern, daß eine Porphyrintyp - Gewebe abhängige Wechselwirkung besteht, ist nicht zwingend.

In Circulation, Vol. 90, No. 4, 1994, Part 2, Page 1468, Abstr. No. 2512, berichten Ni et al., daß sie mit einem Mn-Tetrphenyl-porphyrin (Mn-TPP) und einem Gd-30 Mesoporphyrin (Gd-MP) Infarktbereiche gut darstellen können.

Beide Substanzen sind Gegenstand der Anmeldung WO 95/31219.

Bei szintigraphischen Verfahren liegt die eingesetzte Dosis im Nanomolbereich. Die Verträglichkeit der Substanzen spielt daher nur eine untergeordnete Rolle. Beim MR-imaging liegt die Dosis jedoch im Milimolbereich. Hier spielt die Verträglichkeit eine ganz entscheidende Rolle.

5

Die für MnTPP bzw. MnTPPS bestimmten geringen akuten Verträglichkeiten (LD50) schließen ihre Verwendung am Menschen aus.

Hinzu kommt, daß Porphyrine – wie auch z.B. Gd-Mesoporphyrin - dazu neigen, sich in
10 der Haut abzulagern, was zu einer Photosensibilisierung führt. Diese Sensibilisierung kann Tage, ja sogar Wochen andauern. Bei szintigraphischen Verfahren würde dieser Effekt infolge der geringen Dosis ohne Bedeutung sein. Gegen eine breite Anwendung szintigraphischer Verfahren spricht jedoch, daß die Auflösung einer Gamma-Kamera sehr viel geringer als die ist, die beim MR-imaging zu erreichen ist.

15

Für das MR-imaging des Myocardinfarktes fanden auch die Gd-Komplexe der DTPA (K. Bockhorst et al., Acta Neurochir. (1997) Suppl., 60:347-349); De Roos et al., Radiology 1989; 172:717-720) und ihres Bis(methylamids) (M. Saeed et al., Radiology, 1992; 182:675-683) Verwendung. Es zeigte sich, daß beide Kontrastmittel nur in einem
20 engen Zeitfenster eine Differenzierung zwischen gesundem und infarziertem Gewebe ermöglichen. Vergleichbare Resultate wurden auch mit der Manganverbindung der DTPA (Immunomedics, WO 94/22490) und der DPDP (Radiology 1989; 172:59-64) erreicht.

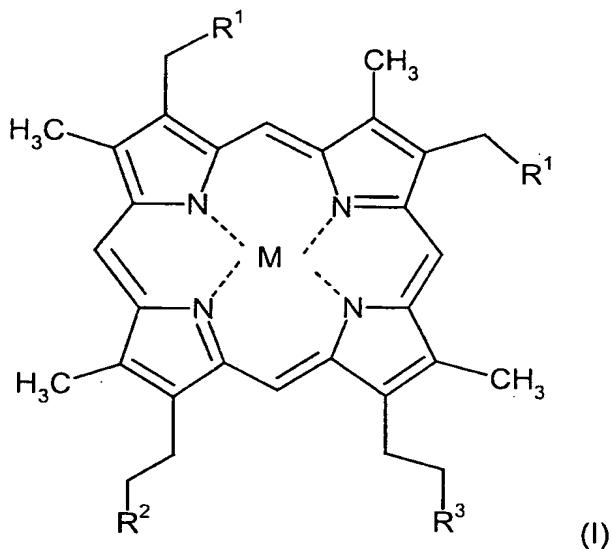
Eine deutliche Verbesserung erzielten Weissleder et al., Radiology 1992; 182:675-683,
25 die Antimyosin an Eisenoxide (MION) koppelten. Aufgrund seiner spezifischen Struktur ist dieses Kontrastmittel nicht für das Nekroseimaging geeignet.

Es besteht daher der dringende Bedarf, Verbindungen für das MR-Infarkt- und Nekrose-imaging zu haben die:

30 sehr gut verträglich sind,
nicht phototoxisch sind,
chemisch stabil sind,
vollständig ausgeschieden werden,

- sich in Nekrosen anreichern,
- sich nicht in der Haut anreichern,
- eine hohe Relaxivity besitzen,
- eine hohe Wasserlöslichkeit zeigen,
- 5 ein weites Zeitfenster für die Messung liefern,
- eine gute Differenzierung zwischen gesundem
- und nekrotischem/infarziertem Gewebe ermöglichen.

Es wurde gefunden, daß überraschenderweise Porphyrinkomplexe bestehend aus einem
 10 Liganden der allgemeinen Formel I



- 15 sowie mindestens einem Ion eines Elementes der Ordnungszahl 20-32, 37-39, 42-51 oder 57-83, worin
 - M für ein paramagnetisches Ion,
 - R¹ für ein Wasserstoffatom, für einen geradkettigen C₁-C₆-Alkylrest, einen C₇-C₁₂-Aralkylrest oder für eine Gruppe OR' worin
 - 20 R' ein Wasserstoffatom oder ein C₁-C₃-Alkylrest ist, steht,
 - R² für R³, eine Gruppe -CO-Z oder eine Gruppe -(NH)₀-(A)_q-NH-D steht, worin

Z eine Gruppe -OL ist, mit L in der Bedeutung eines anorganischen oder organischen Kations oder eines C₁-C₄-Alkylrestes ist,

A eine Phenoxy- oder eine durch ein oder mehrere Sauerstoffatome unterbrochene C₁-C₁₂-Alkylen- oder C₇-C₁₂ Aralkylengruppe bedeutet,

5 o und q unabhängig voneinander die Ziffern 0 oder 1 bedeuten und

D ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe -CO-A-(COOL)₀-(H)_m bedeutet, mit m gleich 0 oder 1 und unter der Maßgabe, daß die Summe aus m und o gleich 1 ist,

10 R³ für eine Gruppe -(C=Q)(NR⁴)₀-(A)_q-(NR⁵)-K steht,

worin Q für ein Sauerstoffatom oder für zwei Wasserstoffatome steht,

R⁴ eine Gruppe -(A)_q-H bedeutet und

K einen Komplexbildner der allgemeinen Formel (IIa), (IIb), (IIc), (IId) oder (IIe) bedeutet, wobei R⁵ für den Fall, daß K ein Komplexbildner der Formel (IIa)

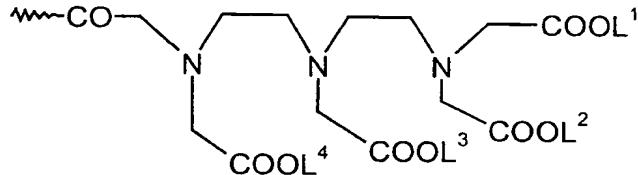
ist die gleiche Bedeutung wie R⁴ hat und R⁵ für den Fall, daß K ein

15 Komplexbildner der Formel (IIb), (IIc), (IId) oder (IIe) ist, die gleiche Bedeutung wie D hat,

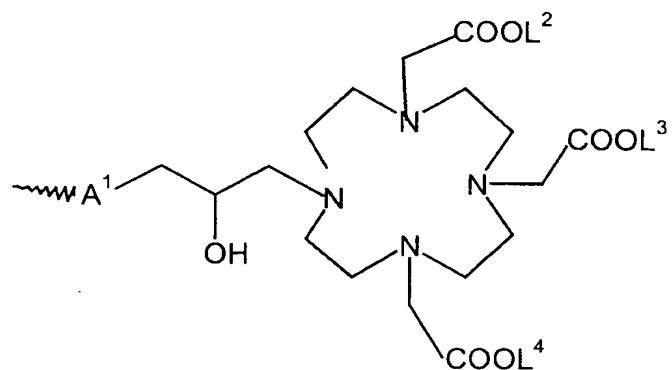
mit der Maßgabe, daß eine direkte Sauerstoff-Stickstoff Bindung nicht zugelassen ist,

und K für einen Komplexbildner der allgemeinen Formel (IIa), (IIb), (IIc), (IId),

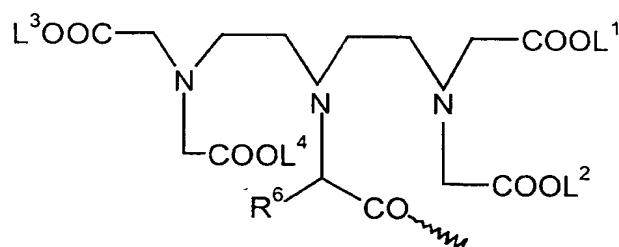
20 (IIe) oder (IIf)



(IIa)

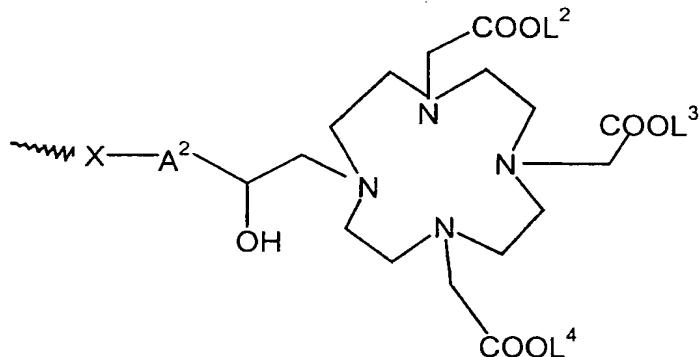


(IIb),

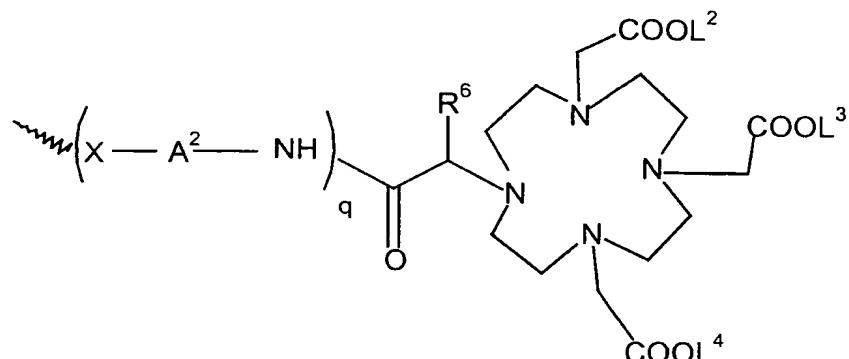


(IIc),

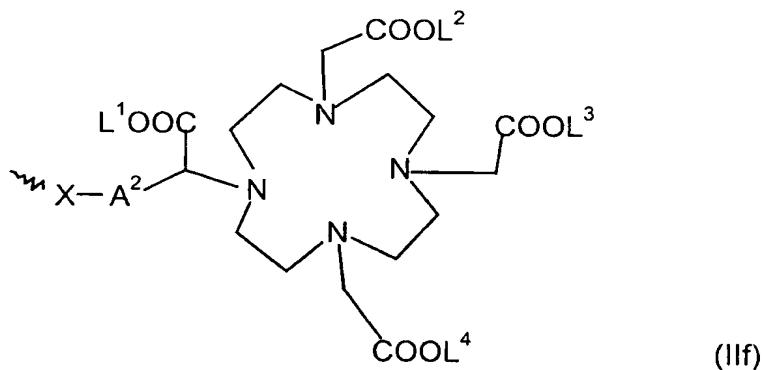
5



(IId),



(IIe),



(IIIf)

5

steht,

worin

q die oben angegebene Bedeutung hat,

10 A^1 die für A angegebene Bedeutung hat,

R^6 für ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte C₁-C₇-Alkylgruppe,

eine Phenyl- oder Benzylgruppe,

15 A^2 für eine Phenyl-, -CH₂-NHCO-CH₂-CH(CH₂COOH)-C₆H₄-β-, -C₆H₄-O-(CH₂)₀₋₅-β-, -C₆H₄-(OCH₂CH₂)₀₋₁-N(CH₂COOH)-CH₂-β

oder eine gegebenenfalls durch ein oder mehrere Sauerstoffatome, 1 bis 3-NHCO-, 1 bis 3 -CONH-gruppen unterbrochene und/oder mit 1 bis 3-(CH₂)₀₋₅COOH-Gruppen substituierte C₁-C₁₂-Alkylen- oder C₇-C₁₂-Alkylengruppe, wobei β für die Bindungsstelle an X steht,

5 X für eine -CO- oder NHCS-gruppe und L¹, L², L³ und L⁴ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom oder ein Metallionenäquivalent eines Elements der oben genannten Ordnungszahl steht, unter den Maßgaben, daß mindestens zwei dieser Substituenten für Metallionenäquivalente stehen, und daß zum Ausgleich gegebenenfalls

10 vorhandener Ladungen im Metalloporphyrin weitere Anionen vorhanden sind und worin freie, nicht zur Komplexierung benötigte Carbonsäuregruppen auch als Salze mit physiologisch verträglich anorganischen und/oder organischen Kationen oder als Ester oder als Amide vorliegen können,

15 überraschenderweise für das Nekrose- und Infarkt-MR-Imaging geeignet sind. Sie erfüllen die an derartige Verbindungen zu stellenden Anforderungen (s.o.). Sie können auch zur Therapiekontrolle in der photodynamischen Therapie (PDT) verwendet werden.

20 Die erfindungsgemäßen Porphyrin-Komplexe enthalten als paramagnetisches Ion im Porphyringerüst das Eisen(III)-, Mangan(III)-, Kupfer(II)-, Cobalt(III), Chrom(III)-, Nickel(II)- oder Vanadyl(II)-Ion, wobei die drei erstgenannten bevorzugt sind.

Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen Komplexe gegenüber den bislang 25 bekannten, strukturell ähnlichen Verbindungen eine deutlich höhere Relaxivität. Da die Relaxivität als ein Maß für die Kontrastmittelwirksamkeit einer Verbindung angesehen werden kann, gelingt bei Verwendung der erfindungsgemäßen Komplexe im Bereich der NMR-Diagnostik eine vergleichbare, positive Signalbeeinflussung schon bei einer niedrigen Dosis. Dadurch vergrößert sich der Sicherheitsabstand signifikant, für den als 30 Richtwert das Produkt aus Relaxivität und Verträglichkeit angesehen werden kann.

Sofern eines der im Porphyrin gebundenen Ionen in einer höheren Oxidationsstufe als +2 vorliegt, so wird (werden) die überschüssige(n) Ladung(en) z.B. durch Anionen von

organischen oder anorganischen Säuren, bevorzugt durch Acetat-, Chlorid-, Sulfat-, Nitrat-, Tartrat-, Succinat-, und Maleat-Ionen oder durch in R² und/oder R³ vorhandenen negativen Ladungen ausgeglichen.

5

Gewünschtenfalls können die Carboxylgruppen, die nicht für die Komplexierung der Metallionen benötigt werden, als Ester, als Amide oder als Salze anorganischer oder organischer Basen vorliegen. Geeignete Esterreste sind solche mit 1 bis 6 C-Atomen vorzugsweise die Ethylester; geeignete anorganische Kationen sind beispielsweise das

10 Lithium- und das Kalium-Ion und insbesondere das Natrium-Ion. Geeignete Kationen organischer Basen sind solche von primären, sekundären oder tertiären Aminen, wie zum Beispiel Ethanolamin, Diethanolamin, Morphin, Glucamin, N, N-Dimethylglucamin, insbesondere das Meglumin.

15

Bevorzugt stehen R² und R³ jeweils für die Gruppen -CONHNHK, -CONH(CH₂)₂NHK, -CONH(CH₂)₃NHK, -CONH(CH₂)₄NHK und -CONH(CH₂)₂O(CH₂)₂NHK, wobei die erste Gruppe bevorzugt ist, R² und R³ stehen bevorzugt für den gleichen Rest.

A² steht bevorzugt für eine Alkylen-, -CH₂-, -(CH₂)₂-, -CH₂OC₆H₄-β, -CH₂OCH₂- C₆H₄-, -CH₂-NHCO-CH₂-CH(CH₂COOH)-C₆H₄-β, -C₆H₄-OCH₂-β oder -C₆H₄-OCH₂CH₂-N(CH₂COOH)CH₂-β Gruppe, wobei β für die Bindungsstelle an X steht. X steht bevorzugt für die CO-gruppe.

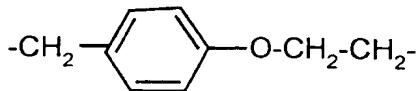
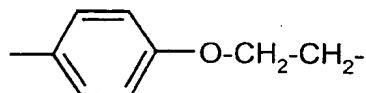
R₆ steht bevorzugt für ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe.

Bevorzugt steht A für

-CH₂-CH₂-

-CH₂CH₂-CH₂-

-CH₂CH₂CH₂CH₂-



-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-

-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-



-(CH₂)₅-

-(CH₂)₆-

-(CH₂)₁₀-

-(CH₂CH₂-O)₂-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-

5

q steht bevorzugt für die Ziffer 0.

Als besondere Verbindungen seien {mu-[{16, 16'-[Chloromangan(III)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-),-Dinatrium, {mu[{16, 16'-[Chloroeisen(III)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-),-Dinatrium,

{mu[{16, 16'-[Kupfer(II)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-

bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-),-Dinatrium genannt.

Als Komplexbildnerrest K seien vorzugsweise Derivate der

5 Diethylentriaminpentaessigsäure und der 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure genannt, die über einen linker an das jeweilige Prophyrin gebunden sind.

Die Herstellung der Komplexverbindungen der allgemeinen Formel I erfolgt nach literaturbekannten Methoden (s. z.B. DE 4232925 für II a und II b; s. z.B.

10 DE 19507822, DE 19580858 und DE 19507819 für III c; s. z.B. US-5,053,503, WO 96/02669, WO 96/01655, EP 0430863, EP 255471, US-5,277,895, EP 0232751, US-4,885,363 für II d, II e und II f).

Die Verbindungen worin R2 und R3 für CONHNHK-gruppen stehen, sind bevorzugt.

15 Die Synthese des hierfür als Edukt benötigten 3, 3'-(7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl)di(propanohydrazid) wird in Z. Physiol Chem. 241, 209 (1936) beschrieben.

20 Die Einführung der gewünschten Metalle (z.B. Mn) in die Porphyrine erfolgt nach literaturbekannten Methoden (z.B. The Porphyrins, ed. D. Dolphin, Academic Press, New York 1980, Vol. V, p. 459; DE 4232925), wobei im wesentlichen zu nennen sind:
a) die Substitution der pyrrolischen NH's (durch Erwärmen des metallfreien Liganden mit dem entsprechenden Metallsalz , vorzugsweise dem Acetat, gegebenenfalls unter
25 Zusatz von säurepuffernden Mitteln, wie z.B. Natriumacetat , in einem polaren Lösungsmittel) oder
b) die "Umkomplexierung", bei der ein bereits vom Liganden komplexiertes Metall durch das gewünschte Metall verdrängt wird.

Als Lösungsmittel sind vor allem polare Solventien, wie z.B. Methanol, Eisessig, 30 Dimethylformamid, Chloroform und Wasser geeignet.

Die Einführung des paramagnetischen Metalls M in das Porphyrinsystem kann vor oder nach Anknüpfung des Komplexbildner-Restes K erfolgen. Dadurch wird eine besonders

flexible Vorgehensweise für die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen ermöglicht.

Die Chelatisierung des Restes K erfolgt in literaturbekannter Weise (siehe z.B.

DE 34 01 052) indem das Metalloxid oder -salz (z.B. das Nitrat, Acetat, Carbonat,

- 5 Chlorid oder Sulfat) des jeweils gewünschten Metalls, in polaren Lösungsmitteln wie Wasser oder wäßrigen Alkoholen suspendiert oder gelöst wird und mit der entsprechenden Menge des komplexbildenden Liganden umgesetzt wird. Soweit gewünscht, können vorhandene acide Wasserstoffatome oder Säuregruppen durch Kationen anorganischer und/oder organischer Basen oder Aminosäuren substituiert
- 10 werden.

Die Neutralisation erfolgt dabei mit Hilfe anorganischer Basen wie z.B. Alkali- oder Erdalkali-hydroxiden, -carbonaten oder -bicarbonaten und/oder organischer Basen wie unter anderem primärer, sekundärer und tertiärer Amine, wie z.B. Ethanolamin,

- 15 Morpholin, Glucamin, N-Methyl- und N,N-Dimethylglucamin, sowie basischer Aminosäuren, wie z.B. Lysin, Arginin und Ornithin oder von Amiden ursprünglich neutraler oder saurer Aminosäuren.

- 20 Zur Herstellung der neutralen Komplexverbindungen kann man beispielsweise den sauren Komplexsalzen in wäßriger Lösung oder Suspension soviel der gewünschten Basen zusetzen, daß der Neutralpunkt erreicht wird. Die erhaltene Lösung kann anschließend im Vakuum zur Trockne eingeengt werden. Häufig ist es von Vorteil, die gebildeten Neutralsalze durch Zugabe von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln, wie zum Beispiel niederen Alkoholen (z.B. Methanol, Ethanol, Isopropanol), niederen
- 25 Ketonen (z.B. Aceton), polaren Ethern (z.B. Tetrahydrofuran, Dioxan, 1,2-Dimethoxyethan) auszufällen und so leicht zu isolierende und gut zu reinigende Kristallisate zu erhalten. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, die gewünschte Base bereits während der Komplexbildung der Reaktionsmischung zuzusetzen und dadurch einen Verfahrensschritt einzusparen.

30

Enthalten die sauren Komplexverbindungen mehrere freie acide Gruppen, so ist es oft zweckmäßig, neutrale Mischsalze herzustellen, die sowohl anorganische als auch organische Kationen als Gegenionen enthalten.

Dies kann beispielsweise geschehen, indem man den komplexbildenden Liganden in wäßriger Suspension oder Lösung mit dem Oxid oder Salz des das Zentralion liefernden Elements und der Hälfte des zur Neutralisation benötigten Menge einer organischen

- 5 Base umsetzt, das gebildete Komplexsalz isoliert, es gewünschtenfalls reinigt und dann zur vollständigen Neutralisation mit der benötigten Menge anorganischer Base versetzt. Die Reihenfolge der Basenzugabe kann auch umgekehrt werden.

- 10 Eine andere Möglichkeit, zu neutralen Komplexverbindungen zu kommen, besteht darin, die verbleibenden Säuregruppen im Komplex ganz oder teilweise in Ester zu überführen. Dies kann durch nachträgliche Reaktion am fertigen Komplex geschehen (z.B. durch erschöpfende Umsetzung der freien Carboxy-Gruppen mit Dimethylsulfat).

- 15 Die Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel erfolgt ebenfalls in an sich bekannter Weise, indem man die erfindungsgemäßen Komplexverbindungen - gegebenenfalls unter Zugabe der in der Galenik üblichen Zusätze - in wäßrigem Medium suspendiert oder löst und anschließend die Suspension oder Lösung gegebenenfalls sterilisiert. Geeignete Zusätze sind beispielsweise physiologisch unbedenkliche Puffer (wie z.B. Tromethamin), geringe Zusätze von Komplexbildnern (wie z.B. Diethylentriaminpentaessigsäure) oder, falls erforderlich, Elektrolyte wie z. B. Natriumchlorid oder, falls erforderlich, Antioxidantien wie z.B. Ascorbinsäure.

- 20 Sind für die enterale Verabreichung oder andere Zwecke Suspensionen oder Lösungen der erfindungsgemäßen Mittel in Wasser oder in physiologischer Salzlösung erwünscht, werden sie mit einem oder mehreren in der Galenik üblichen Hilfsstoff(en) (z.B. Methylcellulose, Lactose, Mannit) und/oder Tensid(en) (z.B. Lecithine, Tween®, Myrij®) und/oder Aromastoffen zur Geschmackskorrektur (z.B. etherischen Ölen) gemischt.

- 30 Prinzipiell ist es auch möglich, die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel auch ohne Isolierung der Komplexsalze herzustellen. In jedem Fall muß besondere Sorgfalt darauf verwendet werden, die Chelatbildung so vorzunehmen, daß die

erfindungsgemäßen Salze und Salzlösungen praktisch frei sind von nicht komplexierten toxisch wirkenden Metallionen.

Dies kann beispielsweise mit Hilfe von Farbindikatoren wie Xylenolorange durch

5 Kontrolltitrationen während des Herstellungsprozesses gewährleistet werden. Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung der Komplexverbindungen und ihrer Salze. Als letzte Sicherheit bleibt eine Reinigung des isolierten Komplexsalzes.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel enthalten vorzugsweise 20 µmol/L bis

10 200 mmol/L des Komplexsalzes und werden in der Regel in Mengen von 1 µmol bis 2 mmol/kg Körpergewicht dosiert, sowohl in ihrer Anwendung für das Nekrose- und Infarkt-MR-Imaging als auch für die Therapiekontrolle mittels MRI-Diagnostik. Sie sind zur enteralen und parenteralen Applikation bestimmt oder werden mit den Methoden der interventionellen Radiologie appliziert.

15

Die erfindungsgemäßen Mittel erfüllen die vielfältigen Voraussetzungen für die Eignung als Mittel für MRI-Kontrastmittel. So sind sie hervorragend dazu geeignet, nach Applikation durch Erhöhung der Signalintensität das mit Hilfe des Kernspintomographen erhaltene Bild in seiner Aussagekraft zu verbessern. Ferner zeigen sie die hohe Wirksamkeit, die notwendig ist, um den Körper mit möglichst geringen Mengen an Fremdstoffen zu belasten und die gute Verträglichkeit, die notwendig ist, um den nichtinvasiven Charakter der Untersuchungen aufrechtzuerhalten.

25

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I sind auch zur Darstellung des Intravasalraums (blood-pool) geeignet.

Die gute Wasserlöslichkeit der erfindungsgemäßen Mittel erlaubt es hochkonzentrierte Lösungen herzustellen, damit die Volumenbelastung des Kreislaufs in vertretbaren Grenzen zu halten und die Verdünnung durch Körperflüssigkeit auszugleichen.

30 Weiterhin weisen die erfindungsgemäßen Mittel nicht nur eine hohe Stabilität in vitro auf, sondern auch eine überraschend hohe Stabilität in vivo, so daß eine Freigabe oder ein Austausch der in den Komplexen nicht konvalent gebundenen - an sich giftigen -

Ionen innerhalb der Zeit, in der die Kontrastmittel vollständig wieder ausgeschieden werden, zu vernachlässigen ist.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

5 a) Acetato [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-dipropionylhydrazinato(2-)-K N21, K N22, K N23, K N24]-Eisen

1190 mg (2 mmol) 3,3'-(7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl)-di(propanohydrazid), hergestellt analog zu H. Fischer, E. Haarer und F. Stadler, Z. Physiol. Chem. 241, 209 (1936), und 706,36 mg (2 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat werden in 150 ml Essigsäure/100 ml Chloroform 5 Stunden auf 70°C erhitzt. Dann wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgeschlämmt, abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das getrocknete Rohprodukt wird aus Pyridin/Diethylether umkristallisiert.

15 Ausbeute: 1,25 g (89 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Elementaranalyse:

ber.:	C 61,10	H 6,12	N 15,84	Fe 7,89
gef.:	C 60,95	H 6,31	N 15,70	Fe 7,68

20

b) Acetato [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis {3, 6, 16-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl) 17-oxa-4, 5, 8, 11, 14-pentaazanonadec-1-yl}porphyinato (3-)]-Eisen

25

806,8 mg (2 mmol) 3-Ethoxy-carbonylmethyl-6-[2-(2,6-dioxomorpholino)ethyl]-3,6-diazaoctandi-säure (DTPA-monoethylester-monoanhydrid) werden in 250 ml absolutem Dimethylformamid suspendiert. Man überschichtet mit Stickstoff, setzt 1,0 g (10 mmol) Triethylamin und 707 mg (1 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 1a zu und röhrt das resultierende Reaktionsgemisch 3 Tage bei Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und das verbleibende Öl mit 500 ml Diethylether verrieben. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Diethylether und n-Hexan gewaschen.

Zur Reinigung wird an Kieselgel RP-18 chromatographiert (Eluens:

H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).

Ausbeute: 1,62 g (93 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Wassergehalt: 5,2 %

5

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 53,93 H 6,19 N 12,95 Fe 3,69

gef.: C 53,75 H 6,37 N 12,81 Fe 3,49

10

c) Chloro [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis{3, 6, 18-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl)-4, 5, 8, 11, 14-pentaazahexadecanato}porphinato(3-)]-Eisen

15 1,59 g (0,660 mmol) des unter Beispiel 1b hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst. Durch Zugabe von 10 molarer wäßriger Natronlauge wird pH 13 eingestellt und 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollzogener Verseifung der Estergruppen wird mit konzentrierter Salzsäure pH 3 eingestellt. Man dampft im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird an Kieselgel RP 18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran/Gradient).

20 Ausbeute: 0,89 g (95 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Wassergehalt: 6,1 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 51,90 H 5,76 N 13,67 Fe 3,89 Cl 2,47

25 gef.: C 51,75 H 5,88 N 13,54 Fe 3,75 Cl 2,38

30 d) {mu-[{16, 16'-[Chloroeisen(III) -7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaaza-hexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-), Dinatrium

0,86 g (0,599 mmol) des unter Beispiel 1c hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst und abwechselnd portionsweise 316,3 mg 1,2 mmol)

Gadoliniumchlorid und 2n wäßrige Natronlauge zugesetzt, so daß der pH-Wert des Reaktionsgemisches stets zwischen 6,8 und 7,2 pendelt. Ist alles Gadoliniumchlorid zugesetzt, wird über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand an Kieselgel RP-18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).

5 Ausbeute: 1,04 g (98 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Wassergehalt: 6,9 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

10 ber.: C 41,67	H 4,17	N 10,97	Gd 17,60	Fe 3,13	Cl 1,98	Na 2,61
gef.: C 41,48	H 4,32	N 10,80	Gd 17,43	Fe 3,07	Cl 1,78	Na 2,38

Beispiel 2

15

a) Acetato [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-dipropionyl-hydrazinato (2-)-K N21, K N22, K N23, K N24]-Mangan

20

1190 mg (2 mmol) 3,3'-(7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2,18-diy)-di(propanohydrazid), hergestellt analog zu H. Fischer, E. Haarer und F. Stadler, Z. Physiol. Chem. 241, 209; (1936), und 704,5 mg (2 mmol) Mangan(III)-acetylacetonat-Dihydrat werden in 150 ml Essigsäure/100 ml Chloroform 5 Stunden auf 80°C erhitzt. Dann wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgeschlämmt, abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das getrocknete Rohprodukt wird aus Pyridin/ Diethylether umkristallisiert.

25

Ausbeute: 1,29 g (91 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Elementaranalyse:

ber.: C 61,18	H 6,13	N 15,86	Mn 7,77
30 gef.: C 61,03	H 6,29	N 15,75	Mn 7,58

b) Acetato [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis {3, 6, 18-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl) 17-oxa-4, 5, 8, 11, 14-pentaazanonadec-1-yl}porphyrinato(3-)]-Mangan

5 806,8 mg (2 mmol) 3-Ethoxy-carbonylmethyl-6-[2-(2,6-dioxomorpholino)ethyl]-3,6-diazaoctandi-säure (DTPA-monoethylester-monoanhydrid) werden in 250 ml absolutem Dimethylformamid suspendiert. Man überschichtet mit Stickstoff, setzt 1,0 g (10 mmol) Triethylamin und 706 mg (1 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 2a zu und röhrt das resultierende Reaktionsgemisch 3 Tage bei

10 Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und das verbleibende Öl mit 500 ml Diethylether verrieben. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Diethylether und n-Hexan gewaschen. Zur Reinigung wird an Kieselgel RP-18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).

15 Ausbeute: 1,35 g (89 % d. Th.) rotbraunes Pulver
Wassergehalt: 5,9 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 53,96 H 6,19 N 12,96 Mn 3,63
20 gef.: C 53,83 H 6,34 N 12,81 Mn 3,49

c) Chloro [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis{3, 6, 18-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl)-4, 5, 8, 11, 14-pentaazahexadecanoato}porphinato(3-)]-Mangan

25 1,31 g (0,865 mmol) des unter Beispiel 2b hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst. Durch Zugabe von 10 molarer wäßriger Natronlauge wird pH 13 eingestellt und 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollzogener Verseifung der Estergruppen wird mit konzentrierter Salzsäure pH 3 eingestellt. Man dampft im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird an Kieselgel RP 18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran/Gradient).
Ausbeute: 1,15 g (93 % d. Th.) rotbraunes Pulver
Wassergehalt: 7,2 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 51,93 H 5,76 N 13,68 Mn 3,83 Cl 2,47

gef.: C 51,81 H 5,93 N 13,49 Mn 3,70 Cl 2,32

5

d) {mu-[(16, 16'-[Chloromangan(III)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-),-Dinatrium

10

1,12 g (0,781 mmol) des unter Beispiel 2c hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst und abwechselnd portionsweise 411,8 mg (1,56 mmol) Gadoliniumchlorid und 2n wäßrige Natronlauge zugesetzt, so daß der pH-Wert des Reaktionsgemisches stets zwischen 6,8 und 7,2 pendelt. Ist alles Gadoliniumchlorid zugesetzt, wird über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand an Kieselgel RP-18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).

15

Ausbeute: 1,35 g (97 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Wassergehalt: 6,5 %

20

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 41,69 H 4,18 N 10,98 Gd 17,61 Mn 3,08 Cl 1,98 Na 2,57

gef.: C 41,48 H 4,33 N 10,81 Gd 17,50 Mn 2,89 Cl 1,85 Na 2,34

25

30

Beispiel 3

a) Acetato[7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionylhydrazinato(2-)-K N21, K N22, K N23, K N24]-Kobalt

1190 mg (2 mmol) 3,3'-(7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2,18-diyl)-
5 di(propanohydrazid), hergestellt analog zu H. Fischer, E. Haarer und F. Stadler, Z.
Physiol. Chem. 241, 209 (1936), und 712,52 mg (2 mmol) Kobalt(III)-
acetylacetone werden in 150 ml Essigsäure/100 ml Chloroform 5 Stunden auf 80°C
erhitzt. Dann wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Wasser aufge-
schlämmt, abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das getrocknete Rohprodukt wird
10 aus Pyridin/ Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 1,31 g (92 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Elementaranalyse:

ber.:	C 60,84	H 6,10	N 15,77	Co 8,29
15 gef.:	C 60,71	H 6,29	N 15,58	Co 8,14

b) Acetato[7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis{3, 6, 18-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl)-17-oxa-4, 5, 8, 11, 14-pentaazanonadec-1-yl}porphinato(3-)]-
20 Kobalt

806,8 mg (2 mmol) 3-Ethoxy-carbonylmethyl-6-[2-(2,6-dioxomorpholino)ethyl]-
3,6-diaza octandi-säure (DTPA-monoethylester-monoanhydrid) werden in 250 ml
absolutem Dimethylformamid suspendiert. Man überschichtet mit Stickstoff, setzt
1,0 g (10 mmol) Triethylamin und 710 mg (1 mmol) der Titelverbindung aus
25 Beispiel 3a zu und röhrt das resultierende Reaktionsgemisch 3 Tage bei
Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wird filtriert, das Lösungsmittel im
Vakuum abgezogen und das verbleibende Öl mit 500 ml Diethylether verrieben. Der
ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Diethylether und n-Hexan gewaschen.
30 Zur Reinigung wird an Kieselgel RP-18 chromatographiert (Eluens:
H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).
Ausbeute: 1,32 g (87 % d. Th.) rotbraunes Pulver
Wassergehalt: 6,7 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 53,82 H 6,18 N 12,92 Co 3,88

gef.: C 53,72 H 6,35 N 12,81 Co 3,69

5

c) Chloro [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis{3, 6, 18-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl)-4, 5, 8, 11, 14-pentaazahexadecanoato}porphinato(3-)]-Kobalt

10 1,28 g (0,844 mmol) des unter Beispiel 3b hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst. Durch Zugabe von 10 molarer wäßriger Natronlauge wird pH 13 eingestellt und 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollzogener Verseifung der Estergruppen wird mit konzentrierter Salzsäure pH 3 eingestellt. Man dampft im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird an Kieselgel RP 18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran/Gradient).
15 Ausbeute: 1,15 g (95 % d. Th.) rotbraunes Pulver
Wassergehalt: 4,9 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

20 ber.: C 51,79 H 5,75 N 13,64 Co 4,10 Cl 2,47

gef.: C 51,60 H 5,89 N 13,51 Co 3,97 Cl 2,35

25 d) {mu-[{16, 16'-[Chlorokobalt(III)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2,18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)}-digadolinato(2-), Dinatrium

30 1,12 g (0,779 mmol) des unter Beispiel 3c hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst und abwechselnd portionsweise 410,6 mg (1,59 mmol) Gadoliniumchlorid und 2n wäßrige Natronlauge zugesetzt, so daß der pH-Wert des Reaktionsgemisches stets zwischen 6,8 und 7,2 pendelt. Ist alles Gadoliniumchlorid zugesetzt, wird über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt. Zur Aufarbeitung wird

das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand an Kieselgel RP-18 chromatographiert

(Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).

Ausbeute: 1,34 g (96 % d. Th.) rotbraunes Pulver

5 Wassergehalt: 7,8 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 41,59 H 4,17 N 10,95 Gd 17,57 Co 3,29 Cl 1,98 Na 2,57

gef.: C 41,48 H 4,32 N 10,84 Gd 17,43 Co 3,14 Cl 1,81 Na 2,31

10

Beispiel 4

15

a) [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionylhydrazinato (2-)-K N21, K N22, K N23, K N24]-Kupfer

20 1190 mg (2 mmol) 3,3'-(7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2,18-diyl)-di(propanohydrazid), hergestellt analog zu H. Fischer, E. Haarer und F. Stadler, Z. Physiol. Chem. 241, 209 (1936), und 523,5 mg (2 mmol) Kupfer(II)-acetylacetonat werden in 150 ml Essigsäure/100 ml Chloroform 5 Stunden auf 80°C erhitzt. Dann wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgeschlämmt, abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das getrocknete Rohprodukt wird aus Pyridin/ Diethyl-25 ether umkristallisiert.

Ausbeute: 1,19 g (91 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Elementaranalyse:

30 ber.: C 62,22 H 6,14 N 17,07 Cu 9,68

gef.: C 62,10 H 6,33 N 16,92 Cu 9,51

b) [7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis{3, 6, 18-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl)-17-oxa-4, 5, 8, 11, 14-pentaazanonadec-1-yl}-porphinato(2-)]-Kupfer

5 806,8 mg (2 mmol) 3-Ethoxy-carbonylmethyl-6-[2-(2,6-dioxomorpholino)ethyl]-3,6-diaza octandi-säure (DTPA-monoethylester-monoanhydrid) werden in 250 ml absolutem Dimethylformamid suspendiert. Man überschichtet mit Stickstoff, setzt 1,01 g (10 mmol) Triethylamin und 656 mg (1 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 4a zu und röhrt das resultierende Reaktionsgemisch 3 Tage bei

10 Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktion wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und das verbleibende Öl mit 500 ml Diethylether verrieben. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und mit Diethylether und n-Hexan gewaschen. Zur Reinigung wird an Kieselgel RP-18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).

15 Ausbeute: 1,27 g (87 % d. Th.) rotbraunes Pulver
Wassergehalt: 6,2 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 54,18 H 6,20 N 13,40 Cu 4,34
20 gef.: C 54,02 H 6,31 N 13,29 Cu 4,18

c) [7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis{3, 6, 18-trioxo-8, 11, 14-tris(carboxymethyl)-4, 5, 8, 11, 14-pentaazahexadecanoato}porphinato(2-)]-Kupfer

25 1,24 g (0,848 mmol) des unter Beispiel 4b hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst. Durch Zugabe von 10 molarer wäßriger Natronlauge wird pH 13 eingestellt und 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollzogener Verseifung der Estergruppen wird mit konzentrierter Salzsäure pH 3 eingestellt. Man dampft im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird an Kieselgel RP 18 chromatographiert (Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran/Gradient).
Ausbeute: 1,15 g (96 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Wassergehalt: 4,4 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 52,93 H 5,87 N 13,94 Cu 4,52

5 gef.: C 52,83 H 6,04 N 13,85 Cu 4,38

d) {mu-[{16, 16'-[Kupfer(II)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2,18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-), Dinatrium

10 1,12 g (0,796 mmol) des unter Beispiel 4c hergestellten Liganden werden in 400 ml Wasser gelöst und abwechselnd portionsweise 420 mg (1,59 mmol) Gadoliniumchlorid und 2n wäßrige Natronlauge zugesetzt, so daß der pH-Wert des Reaktionsgemisches stets zwischen 6,8 und 7,2 pendelt. Ist alles Gadoliniumchlorid zugesetzt, wird über Nacht bei Raumtemperatur nachgeführt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand an Kieselgel RP-18 chromatographiert
(Eluens: H₂O/Tetrahydrofuran: 0-30 %).

15 Ausbeute: 1,37 g (98 % d. Th.) rotbraunes Pulver

Wassergehalt: 7,6 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 42,32 H 4,24 N 11,15 Gd 17,88 Cu 3,61 Na 2,61

20 gef.: C 42,18 H 4,38 N 11,09 Gd 17,70 Cu 3,48 Na 2,47

Beispiel 5

a) Acetato {7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethyl-2, 18-bis[15, 15-dimethyl-3, 6, 13-trioxo-8-(2-{N, N-bis[(t butoxycarbonyl)methyl]amino}-ethyl)-11-[(t butoxycarbonyl)-methyl]14-oxa-4, 5, 8, 11-tetraazahexadec-1-yl}-porphyrinato(3-)Mangan

8,31 g (13,45 mmol) 3,9-Bis(t-butoxycarbonyl)methyl]-6-carboxymethyl-3,6,9-triazaundecanidisäure-di-t-butylester, und 2,09 g (15 mmol) 4-Nitrophenol werden in 60 ml Dimethylformamid gelöst und bei 0°C 5,16 g (25 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Man röhrt 3 Stunden bei 0°C, dann über Nacht bei 5 Raumtemperatur. Zu der so hergestellten Aktivester-Lösung tropft man 2,37 g (3,36 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 2a, (gelöst in 50 ml Pyridin) zu und röhrt über Nacht. Man gibt 100 ml einer 5 %igen aqu. Ammoniumchlorid-Lösung zu, dampft im Vakuum zur Trockne ein und chromatographiert den Rückstand an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/2-Propanol= 20:1).

10 Ausbeute: 5,25 g (83 % d. Th.) eines dunkelbraunen Feststoffes

Elementaranalyse:

ber.:	C 59,97	H 7,82	N 10,42	Mn 2,92	Cl 1,88
15 gef.:	C 59,83	H 8,03	N 10,28	Mn 2,83	Cl 1,67

b) {mu-[Acetatomangan(III)-{13, 13'-[7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis{3-carboxymethyl-6-(2-{N, N-bis[(carboxy) methyl]amino}ethyl)-8, 11-dioxo-3, 6, 9, 10-tetraazatridecanoato]}(8-)]}digadolinato(2-),
20 Dinatrium

5,25 g (2,79 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 5a werden in 100 ml Trifluoressigsäure gelöst und 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man dampft im 25 Vakuum zur Trockne ein. Der so erhaltene Ligand wird in 100 ml Wasser gelöst und 1,01 g (2,79 mmol) Gadoliniumoxid zugegeben. Man röhrt bei 60 °C und hält durch Zugabe von 1 N aqu. Natronlauge den pH-Wert bei 5. Die Lösung wird filtriert und das Filtrat mit 1 N aqu. Natronlauge auf pH 7,2 gestellt. Anschließend wird an RP 18 chromatographiert (Laufmittel: Gradient aus Wasser/Acetonitril).
30 Ausbeute: 4,63 g (93 % d. Th.) eines braunen, amorphen Feststoffes
Wassergehalt: 9,2 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 41,69 H 4,18 N 10,98 Mn 3,08 Cl 1,98 Gd 17,61 Na 2,57
 gef.: C 41,54 H 4,35 N 10,82 Mn 2,91 Cl 1,85 Gd 17,45 Na 2,34

5 **Beispiel 6**

a) {10, 10'-(my-Acetatomangan(III)-{10, 10'-(7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl)bis[(1RS)-1-methyl-2, 5, 8-trioxo-3, 6, 7-triaza-dec-1-yl]})bis[1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecan-1, 4, 7-triacetato(3-)]}digadolinium

10 8,47 g (13,45 mmol) des Gd-Komplexes der 10-(4-Carboxy-2-oxo-3-aza-1-methylbutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure, 0,64 g Lithiumchlorid (15 mmol) und 2,09 g (15 mmol) 4-Nitrophenol werden in 100 ml Dimethylsulfoxid bei 50°C gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 5,16 g (25 mmol) 15 N,N'Dicyclohexylcarbodiimid zugesetzt und 12 Stunden voraktiviert. Zu der so hergestellten Lösung gibt man 2,37 g (3,36 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 2a 0,71 g (7 mmol) Triethylamin und röhrt über Nacht bei Raumtemperatur. Die erhaltene Suspension wird anschließend mit ausreichend Aceton bis zur 20 vollständigen Fällung versetzt, der Niederschlag abgesaugt, getrocknet, in Wasser aufgenommen, von unlöslichem Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat an RP 18 chromatographiert (Laufmittel: Gradient aus Tetrahydrofuran/Wasser). Ausbeute: 5,06 g (79 % d. Th.) eines dunkelbraunen amorphen Pulvers
 Wassergehalt: 8,3 %

25 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 45,36 H 5,08 N 13,22 Gd 16,50 Mn 2,88 Cl 1,86
 gef.: C 45,24 H 5,21 N 13,13 Gd 16,38 Mn 2,71 Cl 1,72

Beispiel 7

30 a) Konjugat aus Acetato [7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-dipropionylhydrazinato (2-)- K N21, K N22, K N23, K N24]-Eisen und dem 10-[7-(4-Isothiocyanatophenyl)-2-hydroxy-5-oxo-7-(carboxymethyl)-4-aza-heptyl]-1,4,7-

tris(carboxylatomethyl)-1,4,7-tris(carboxylatomethyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododecan, Gadoliniumkomplex, Natriumsalz
{10,10'-{my-Chloroeisen(III){10,10'-(7,12-diethyl-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-diyl)bis{(1-oxopropan-3,1-diyl)hydrazino-thiocarbonylamino-4,1-phenylen[(3RS)-3-carboxymethyl-1-oxopropan-3,1-diyl]amino(2-hydroxypropan-3,1-diyl)}}}bis[1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triacetato (4-)]}digadolinium, 5 Dinatrium)

Zu 708 mg (1 mmol) der Titelverbindung aus Beispiel 1a und 1806 mg (2,2 mmol) 10 in 50 ml Wasser gibt man 1,01 g (10 mmol) Triethylamin und röhrt 12 Stunden bei Raumtemperatur. Man dampft im Vakuum zur Trockne ein und chromatographiert an Kieselgel (Laufmittel: Methanol/Wasser/Eisessig= 10/5/1). Die produkthaltigen Fraktionen werden zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 100 ml Wasser 15 gelöst und mit 2 N Natronlauge auf pH 7,2 gestellt. Anschließend wird gefriergetrocknet.

Ausbeute: 2,11 g (92 % d. Th.) eines dunkelbraunen, amorphen Pulvers

Wassergehalt: 8,5 %

20 Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 44,95 H 5,09 N 12,19 Cl 1,54 Fe 2,43 S 2,79 Gd 13,69 Na 2,00

gef.: C 44,83 H 5,19 N 12,03 Cl 1,38 Fe 2,38 S 2,58 Gd 13,48 Na 1,78

25

Beispiel 8

30

Herstellung einer Formulierung des {mu-[{16,16'-(Chloroeisen (III)-7,12-diethyl-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-diyl)-bis[3,6,9-tris(carboxymethyl)-11,14-dioxo-3,

6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)}-digadolinato(2-), Dinatrium (Zusatz von Mannitol)

50 mmol der Titelverbindung aus Beispiel 1d, 10 mmol Tris-Puffer (Tris(hydroxy-
5 methyl)aminomethan Salzsäure pH 7,4) und 120 mmol Mannitol werden in 500 ml
bidestilliertem Wasser gelöst und im Meßkolben mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt.
Die so erhaltene Lösung wird über eine 0,2 µm Membran filtriert und in Vials abgefüllt.
Eine so hergestellte Lösung kann direkt für die NMR-Diagnostik verwendet werden.

10

Beispiel 9

Herstellung einer Formulierung des {mu-[{16, 16'-[Chloromangan(III)-7, 12-diethyl-3,
8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-
15 3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)}-digadolinato(2-),-Dinatrium (Zusatz von
Kochsalz)

10 mmol der Titelverbindung aus Beispiel 2d, 10 mmol Tris-Puffer (Tris(hydroxy-
methyl)aminomethan Salzsäure pH 7,4) und 60 mmol Natriumchlorid werden in 500 ml
20 bidestilliertem Wasser gelöst und im Meßkolben mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt.
Die so erhaltene Lösung wird über eine 0,2 µm Membran filtriert und in Vials abgefüllt.
Eine so hergestellte Lösung kann direkt für die NMR-Diagnostik verwendet werden.

25

Beispiel 10

30

MRI-Experimente an Tieren mit induziertem Myocardinfarkt

Das nekroseselektive Enhancement wurde nach einmaliger intravenöser Applikation der Substanz aus Beispiel 1d an Tieren mit experimentell erzeugtem Myocardinfarkt im MRI Experiment untersucht. Die Induktion der Herzinfarkte erfolgte an narkotisierten (Domitor®/Dormicum®, i.m.) Ratten (Han.Wistar, Schering SPF, ca.300 g KGW)

5 durch Okklusion der linken Coronararterie. Die Kontrastmittelapplikation (Dosis: 100 µmol Gd / kg KGW) erfolgte ca. 24 h nach der Infarktinduktion. Die Tiere wurden vor und bis 24 h nach KM-Applikation MR-tomographisch (SISCO SIS 85, 2 Tesla; SE-Sequenz, EKG-getriggert, T_R : ca. 400 ms, T_E : 10 ms, nt=4, ni=256, FOV: 7*7 cm, SD ≈ 3 mm, je 1 Schicht axial) untersucht. Ca. 24 h p. i. wurden die Tiere - im MRT - durch 10 eine Narkotikaüberdosis getötet und zusätzlich ein MRI-Experiment am „frischtoten“ Tier (→ keine Bewegungsartefakte) durchgeführt. Zur Verifizierung des Infarktes (Größe und Lage) wurde das Herz präpariert, in Scheiben geschnitten und anschließend eine NBT ("Vital-") Färbung durchgeführt. Vor KM-Applikation ist das infarzierte Areal nicht vom „normalen“ Myocard zu unterscheiden, da sich beide Areale isointens 15 darstellen (s. Abb.: 1a). Direkt nach der Substanzapplikation stellt sich der nicht-perfundierte Anteil des Myocards als hypointenses Areal dar (s. Abb.: 1b). Ab ca. 30 min p. i. steigt die Signalintensität im nicht-perfundierten Areal etwas an bzw. die Größe des abgegrenzten (signalarmen) Areals nimmt ab (→ langsame Diffusion in die Nekrose). In der mittleren und v. a. späten Phase (ab 2.5 bis ca. 24 h p. i.) ist ein 20 deutliches Enhancement im nekrotischen Areal des Myocards festzustellen (s. Abb.: 1c, d, e). Die Abgrenzung des nekrotischen Areals im MRI-Experiment korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der histologischen "Vital"-Färbung.

Beispiel 11

25

MRI-Experimente an Tieren mit induziertem Myocardinfarkt

Das nekroseselektive Enhancement wurde nach einmaliger intravenöser Applikation der Substanz aus Beispiel 2d an Tieren mit experimentell erzeugtem Myocardinfarkt im

30

MRI Experiment untersucht. Die Induktion der Herzinfarkte erfolgte an narkotisierten (Domitor®/Dormicum®, i.m.) Ratten (Han.Wistar, Schering SPF, ca.300 g KGW) durch Okklusion der linken Coronararterie. Die Kontrastmittelapplikation (Dosis: 100

µmol Gd / kg KGW) erfolgte ca. 24 h nach der Infarktinduktion. Die Tiere wurden vor und bis 3 h (kontinuierlich) sowie 24 h nach KM-Applikation MR-tomographisch (SISCO SIS 85, 2 Tesla; SE-Sequenz, EKG-getriggert, T_R : ca. 400 ms, T_E : 10 ms, nt=4, ni=256, FOV: 7*7 cm, SD ≈ 3 mm, je 1 Schicht axial) untersucht. Ca. 24 h p. i. wurden 5 die Tiere - im MRT - durch eine Narkotikaüberdosis getötet und ein MRI-Experiment am „frischtoten“ Tier (→ keine Bewegungsartefakte) durchgeführt. Zur Verifizierung des Infarktes (Größe und Lage) wurde das Herz präpariert, in Scheiben geschnitten und anschließend eine NBT (nitro blue tetrazolium chlorid) Färbung durchgeführt. Vor KM-Applikation ist das infarzierte Areal nicht vom „normalen“ Myocard zu unterscheiden, 10 da sich beide Areale isointens darstellen (s. Abb.: 2a). Direkt nach der Substanzapplikation stellt sich der nicht-perfundierte Anteil des Myocards als hypointenses Areal dar (s. Abb.: 2b). Ab ca. 30 min p. i. steigt die Signalintensität im nicht-perfundierten Areal etwas an bzw. die Größe des abgegrenzten (signalarmen) Areals nimmt ab (→ langsame Diffusion in die Nekrose). In der mittleren und v. a. 15 späten Phase (ab 2.5 bis ca. 24 h p. i.) ist ein deutliches Enhancement im nekrotischen Areal des Myocards festzustellen (s. Abb.: 2c, 2d). Die Abgrenzung des nekrotischen Areals im MRI-Experiment korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der histologischen NBT ("Vital"-) Färbung.

20

25 **Beispiel 12****MRI-Experimente an Tieren mit induziertem Myocardinfarkt**

Das nekroseselektive Enhancement wurde nach einmaliger intravenöser Applikation der Substanz aus Beispiel 4d an Tieren mit experimentell erzeugtem Myocardinfarkt im 30 MRI Experiment untersucht. Die Induktion der Herzinfarkte erfolgte an narkotisierten (Domitor®/Dormicum®, i. m.) Ratten (Han. Wistar, Schering SPF, ca. 300 g KGW) durch Okklusion der linken Coronararterie. Die Kontrastmittelapplikation (Dosis: 100

µmol Gd / kg KGW) erfolgte ca. 24 h nach der Infarktinduktion. Die Tiere wurden vor und bis 3 h (kontinuierlich) sowie 24 h nach KM-Applikation MR-tomographisch (SISCO SIS 85, 2 Tesla; SE-Sequenz, EKG-getriggert, T_R : ca. 400 ms, T_E : 10 ms, nt=4, ni=256, FOV: 7*7 cm, SD ≈ 3 mm, je 1 Schicht axial) untersucht. Ca. 24 h p. i. wurden die Tiere - im MRT - durch eine Narkotikaüberdosis getötet und ein MRI-Experiment am „frischtoten“ Tier (→ keine Bewegungsartefakte) durchgeführt. Zur Verifizierung des Infarktes (Größe und Lage) wurde das Herz präpariert, in Scheiben geschnitten und anschließend eine NBT (nitro blue tetrazolium chlorid) Färbung durchgeführt. Vor KM-Applikation ist das infarzierte Areal nicht vom „normalen“ Myocard zu unterscheiden, da sich beide Areale isointens darstellen (s. Abb.: 3a). Direkt nach der Substanzapplikation stellt sich der nicht-perfundierte Anteil des Myocards als hypointenses Areal dar (s. Abb.: 3b). Ab ca. 30 min p. i. steigt die Signalintensität im nicht-perfundierten Areal etwas an bzw. die Größe des abgegrenzten (signalarmen) Areals nimmt ab (→ langsame Diffusion in die Nekrose). In der mittleren und v. a. späten Phase (ab 2.5 bis ca. 24 h p. i.) ist ein deutliches Enhancement im nekrotischen Areal des Myocards festzustellen (s. Abb.: 3c, 3d). Die Abgrenzung des nekrotischen Areals im MRI-Experiment korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der histologischen NBT ("Vital"-) Färbung.

20 Beispiel 13

Einwirkung von Licht (ED_{50}) auf eine Tumorzellkultur in Gegenwart von Porphyrinen

In Kulturflaschen von 25 ml Inhalt wird eine Zellkultur von humanem Coloncarcinom (HT-29 P9) 3 Tage bei 37°C vermehrt. Die Kulturen werden in zwei Gruppen aufgeteilt und mit Lösungen der Prüfsubstanzen (50 mmol Porphyrineinheit (PE) /l, verdünnt mit fötalem Kälberserum) in zunehmender Menge (0; 1,5; 5; 8,5; 12; 15,5; 19 µmol PE/l) versetzt. Die Proben werden drei Tage lang mit einer Xenon-Lampe (8,5 k Lux, UV-Filter) bestrahlt. Die erste Gruppe erhält täglich 2 Bestrahlungen von je 30 Minuten Dauer im Abstand von 4 Stunden. Die restliche Zeit bleibt sie im Dunkeln im Brutschrank. Die zweite Gruppe wird nicht belichtet und bleibt die gesamte Zeit im Dunkeln im Brutschrank. Am vierten Tag wird das Zellwachstum durch Lebend-Tot-Färbung und Zählung mit der Zählkammer bestimmt.

In der Tabelle ist die Konzentration angegeben, bei der etwa die Hälfte der Zellen nicht mehr vital ist.

Verbindung	ED ₅₀ [mmol PE/l]
I	> 1,25
II	> 1,25
III	> 1,25
IV	6,4 · 10 ⁻³

5

I Verbindung aus Beispiel 1d

II Verbindung aus Beispiel 2d

III Verbindung aus Beispiel 4d

IV Verbindung aus Beispiel 1c, DE 423 2925

10 IV: des {[mu-[(16, 16'-[7, 12-Diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-
bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-
pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-),-Dinatrium

15 **Beispiel 14**

Bestimmung der Verträglichkeit der Titelverbindung aus Beispiel 2d

20 Es soll die Akute Verträglichkeit der Titelverbindung aus Beispiel 2d nach einmaliger intravenöser Gabe an der Maus untersucht werden.

Versuch:

Testmethode: Methode KM D1, 5. Auflage

Tiermaterial: SPF-Mäuse (NMRI, Schering), 18-22 g, f:m = 50:50

25 Injektionsgeschwindigkeit: 2 ml/min.

Kriterium der Wirksamkeit: exitus letalis

Beobachtungszeitraum: 7 Tage

Die Lebern und Nieren aller überlebenden Tiere waren unauffällig. Es ist eine LD50 [mmol Gd/kg] von ≥ 5 zu erwarten.

5 **Beispiel 15**

Bestimmung der Relaxivity R1 [$\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

Gerät: Minispec PC 20

Messung bei 40°C; 0,47 Tesla

10 T1-Sequenz: 180°-TI-90°, Inversion Recovery

Substanz	Konz. im Ansatz [mmol/L]	Medium	R1
1d	0.19 – 0.71 n = 3	Wasser	11.9 ± 1.0
2d	0.22 – 0.84 n = 3	Wasser	9.3 ± 0.1
4d	0.23 – 0.84 n = 3	Wasser	11.0 ± 0.1
1c, DE 4232925	0.05 – 0.5 n = 3	Wasser	9.2 ± 0.1

Beispiel 16

15

In-vivo-Vergleich, Titelverbindung aus Beispiel 1d mit Dy-DTPA hinsichtlich der Blutkinetik

Als Versuchstiere dienten drei 250 g schwere, männliche (Schering-SPF-) Ratten. Je 20 Tier wurden 0.5 ml eines Kontrastmittel-Gemisches aus der Verbindung aus Beispiel 1d (45 mmol Gd/l), im folgenden Verbindung 1 genannt, und dem Dysprosium-Komplex der (Dy-DTPA, 57 mmol Dy/l), im folgenden Verbindung 2 genannt, intravenös

appliziert. Die dadurch applizierte Dosis betrug 82 μmol Gd/kg (Verbindung 1), bzw. 103 μmol Dy/kg (Verbindung 2). Über einen Katheter in der Arteria carotis communis wurden Blutproben zu folgenden Zeitpunkten entnommen: 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min p.i. In den gewonnenen Blutproben wurden jeweils parallel die

- 5 Konzentrationen an Gadolinium (Gd) und Dysprosium (Dy) mittels Atomemissionsspektrometrie (ICP-AES) gemessen. Der im Blutraum verbliebene Anteil der injizierten Kontrastmittel Verbindung 1 (Gd) und Verbindung 2 (Dy, Vergleichssubstanz) kann durch die unterschiedliche Markierung im gleichen Tier verglichen werden. Aus den Blut- bzw. Plasmakonzentrationen kann mittels spezieller 10 Software (Topfit-Programm) die α -t $\frac{1}{2}$ und β -t $\frac{1}{2}$ Eliminations-Halbwertzeiten, das Verteilungsvolumen sowie die total Clearance für Blut und Plasma errechnet werden. Damit liefern diese Daten Angaben über den Verbleib der Verbindungen im 15 Intravasalraum, die Verteilungsverhältnisse im Organismus und die Eliminierung.

15

Ergebnisse: Die Bluteliminationskinetik von Verbindung 1 unterscheidet sich deutlich von der des extrazellulären Kontrastmittel (Verbindung 2) (siehe Abb. 4, Tab. 1). Die Blutkonzentrationen liegen nach drei Minuten noch bei 56-63 % der Dosis und nach 120 min bei 22-25 % der Dosis. Die Ausscheidung/Diffusion ins Gewebe ist deutlich

- 20 verlangsamt (-Halbwertzeit 173 min). Das Verteilungsvolumen und die Total Clearance sind ebenfalls deutlich kleiner verglichen zum Dy-DTPA, d.h. Verbindung 1 verteilt sich nicht wie Verbindung 2 im Intravasalraum (Gefäße) und im Extrazellularraum, sondern größtenteils nur im Intravasalraum (Blood-Pool-Eigenschaften dieses Porphyrins).

25

Die lange Blutverweildauer von Verbindung 1 deutet auf eine sehr hohe Plasmaproteinbindung. Damit verfügt die im Beispiel beschriebene Verbindung über die Erfordernisse an ein blood-pool-agent.

5

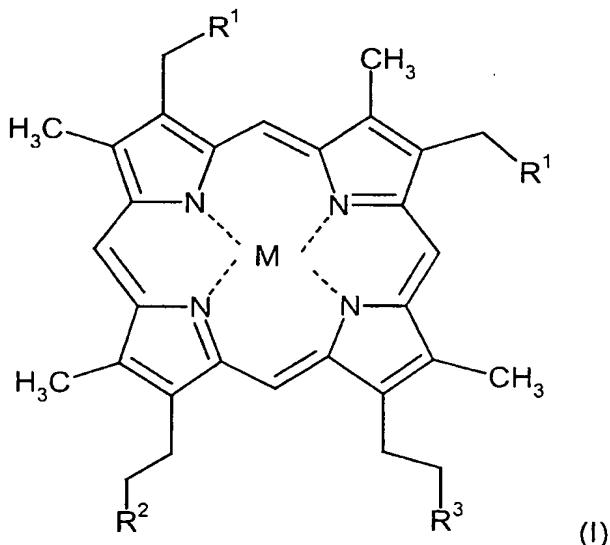
		Verbindung 1	Verbindung 2
$\alpha-t_{1/2}$	min	3.56 ± 1.01	1.19 ± 0.24
$\beta-t_{1/2}$	min	172.90 ± 38.76	18.64 ± 2.47
Vd ss	L/kg	0.08 ± 0.00	0.19 ± 0.01
Total Clearance	ml/min*kg	0.34 ± 0.07	7.74 ± 0.56

Tab.1: Pharmakokinetische Parameter (Plasma), sowie Eliminationshalbwertzeiten von Verbindung 1 im Vergleich zu Verbindung 2 in Ratten (n=3).

Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einem Porphyrin-Komplex bestehend aus einem Liganden der allgemeinen Formel I

5



10 sowie mindestens einem Ion eines Elementes der Ordnungszahl 20-32, 37-39, 42-51 oder 57-83, worin

M für ein paramagnetisches Ion,

R¹ für ein Wasserstoffatom, für einen geradkettigen C₁-C₆-Alkylrest, einen C₇-C₁₂-Aralkylrest oder für eine Gruppe OR' worin

15 R' ein Wasserstoffatom oder ein C₁-C₃-Alkylrest ist, steht,

R² für R³, eine Gruppe -CO-Z oder eine Gruppe -(NH)₀-(A)_q-NH-D steht, worin Z eine Gruppe -OL ist, mit L in der Bedeutung eines anorganischen oder organischen Kations oder eines C₁-C₄-Alkylrestes ist,

20 A eine Phenylenoxy- oder eine durch ein oder mehrere Sauerstoffatome unterbrochene C₁-C₁₂-Alkylen- oder C₇-C₁₂ Aralkylengruppe bedeutet,

o und q unabhängig voneinander die Ziffern 0 oder 1 bedeuten und
 D ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe $-\text{CO}-\text{A}-(\text{COOL})_0-(\text{H})_m$ bedeutet, mit m
 gleich 0 oder 1 und unter der Maßgabe, daß die Summe aus m und o
 gleich 1 ist,

5 R³ für eine Gruppe $-(\text{C}=\text{Q})(\text{NR}^4)_0-(\text{A})_q-(\text{NR}^5)-\text{K}$ steht,

worin Q für ein Sauerstoffatom oder für zwei Wasserstoffatome steht,

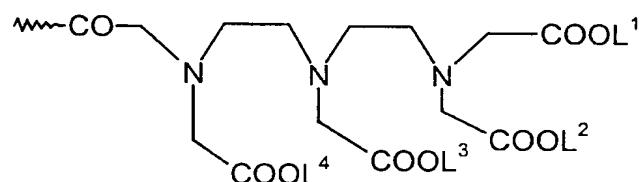
R⁴ eine Gruppe $-(\text{A})_q-\text{H}$ bedeutet und

K einen Komplexbildner der allgemeinen Formel (IIa), (IIb), (IIc), (IId) oder
 (IIe) bedeutet, wobei R⁵ für den Fall, daß K ein Komplexbildner der Formel (IIa) —

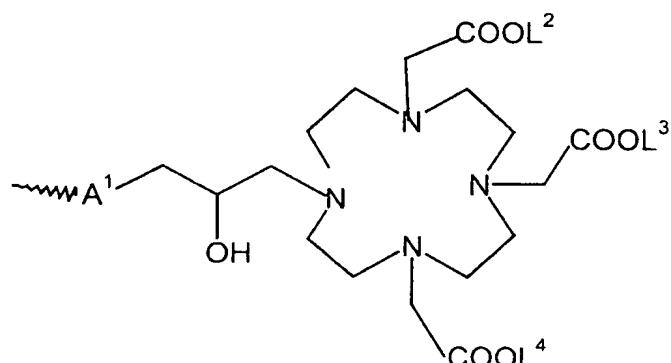
10 ist die gleiche Bedeutung wie R⁴ hat und R⁵ für den Fall, daß K ein
 Komplexbildner der Formel (IIb), (IIc), (IId) oder (IIe) ist, die gleiche
 Bedeutung wie D hat,

mit der Maßgabe, daß eine direkte Sauerstoff-Stickstoff Bindung nicht
 zugelassen ist,

15 und K für einen Komplexbildner der allgemeinen Formel (IIa), (IIb), (IIc), (IId),
 (IIe) oder (IIf)

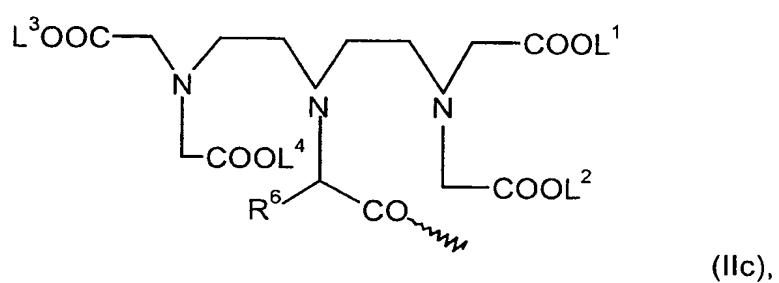


(IIa)

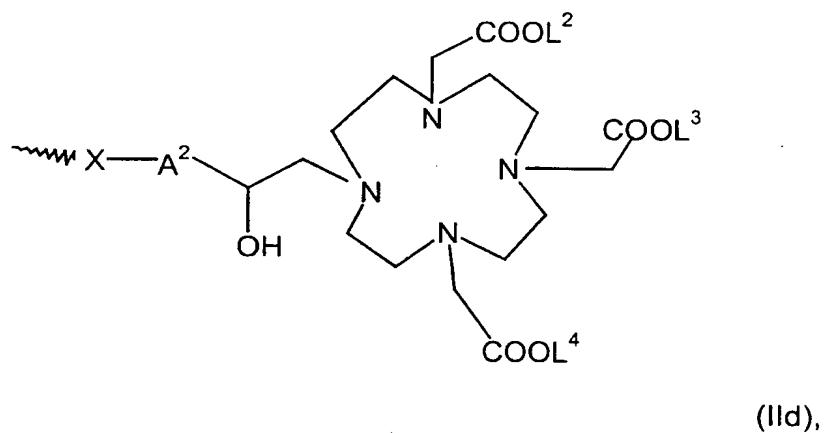


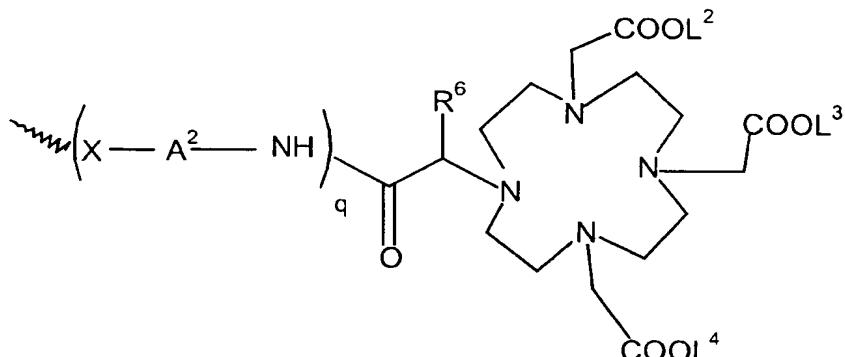
(IIb),

5

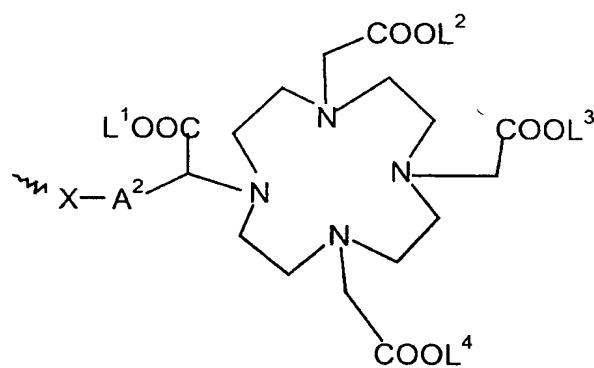


10





(IIe),



(IIIf)

5

steht,

worin

q die oben angegebene Bedeutung hat,

10 A¹ die für A angegebene Bedeutung hat,R⁶ für ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte C₁- C₇-Alkylgruppe,

eine Phenyl- oder Benzylgruppe,

15 A² für eine Phenyl-, -CH₂-NHCO-CH₂-CH (CH₂COOH) -C₆H₄- β -, -C₆H₄-O-(CH₂)₀₋₅- β , -C₆H₄-(OCH₂CH₂)₀₋₁-N(CH₂COOH)-CH₂- β

oder eine gegebenenfalls durch ein oder mehrere Sauerstoffatome,

1 bis 3-NHCO-, 1 bis 3 -CONH-gruppen unterbrochene und/oder mit

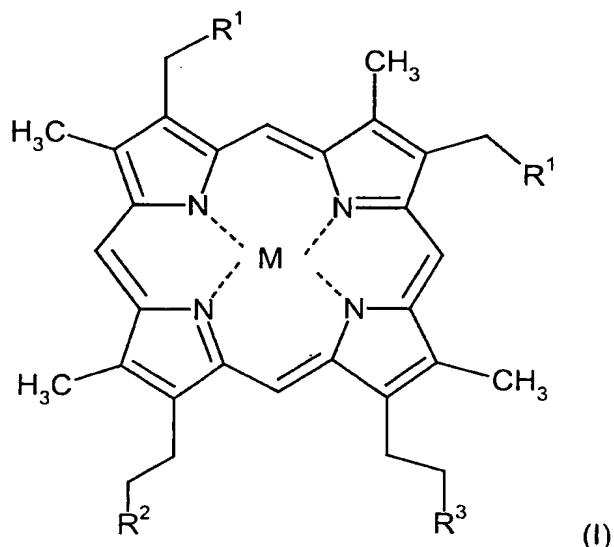
1 bis 3-(CH₂)₀₋₅COOH-Gruppen substituierte C₁-C₁₂-Alkylen- oder C₇-C₁₂-Alkylengruppe, wobei β für die Bindungsstelle an X steht,
X für eine -CO- oder NHCS-Gruppe und
L¹, L², L³ und L⁴ unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom oder ein
5 Metallionenäquivalent eines Elements der oben genannten Ordnungszahl steht,
unter den Maßgaben, daß mindestens zwei dieser Substituenten für
Metallionenäquivalente stehen, und daß zum Ausgleich gegebenenfalls
vorhandener Ladungen im Metallporphyrin weitere Anionen vorhanden sind und
worin freie, nicht zur Komplexierung benötigte Carbonsäuregruppen auch als
10 Salze mit physiologisch verträglich anorganischen und/oder organischen Kationen
oder als Ester oder als Amide vorliegen können,
für die Herstellung von Mitteln für das Nekrose- und Infarkt-MR-Imaging.

15 2. Verwendung von Verbindungen gemäß Formel I von Anspruch 1 für die
Herstellung von MRI-diagnostischen Mitteln für die Therapiekontrolle in der
photodynamischen Therapie (PDT).

20 3. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß M für ein Fe³⁺, Mn³⁺, Cu²⁺, Co³⁺, VO²⁺, Cr³⁺ oder
Ni²⁺-Ion steht.

25 4. Verwendung von Porphyrin-Komplex-Verbindungen der allgemeinen Formel I
gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R² und R³ jeweils für eine
-CONHNHK, -CONH(CH₂)₂NHK, -CONH(CH₂)₃NHK, -CONH(CH₂)₄NHK,
-CONH(CH₂)₂O(CH₂)₂NHK-Gruppe stehen.

5. Porphyrin-Komplex-Verbindungen, bestehend aus einem Liganden der allgemeinen Formel I



5 sowie mindestens einem Ion eines Elementes der Ordnungszahl 20-32, 37-39, 42-51 oder 57-83, worin

M für ein paramagnetisches Ion,

R¹ für ein Wasserstoffatom, für einen geradkettigen C₁-C₆-Alkylrest, einen C₇-C₁₂-Aralkylrest oder für eine Gruppe OR' worin

10 R' ein Wasserstoffatom oder ein C₁-C₃-Alkylrest ist, steht,

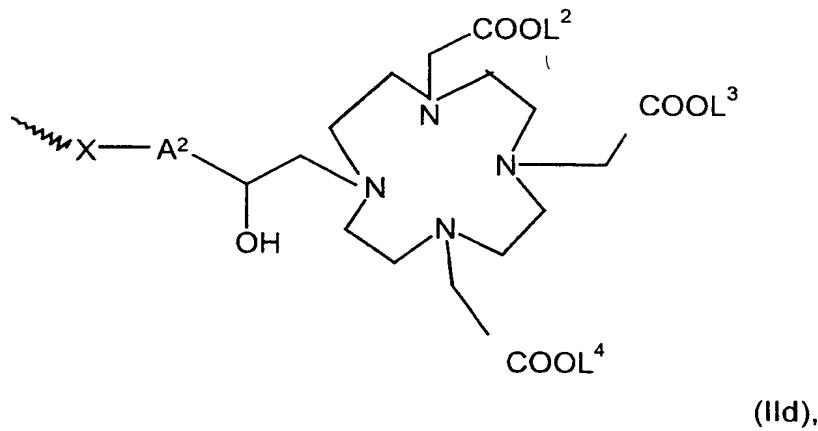
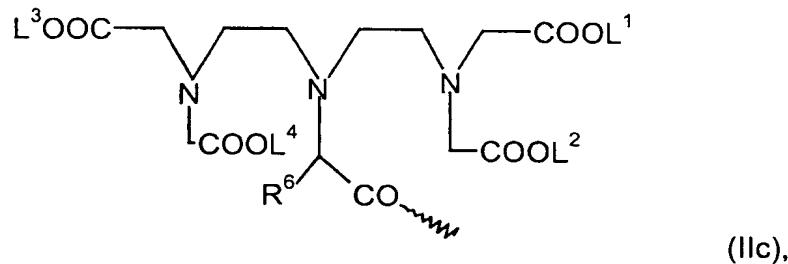
R² für R³, eine Gruppe -CO-Z oder eine Gruppe -(NH)₀-(A)_q-NH-D steht, worin

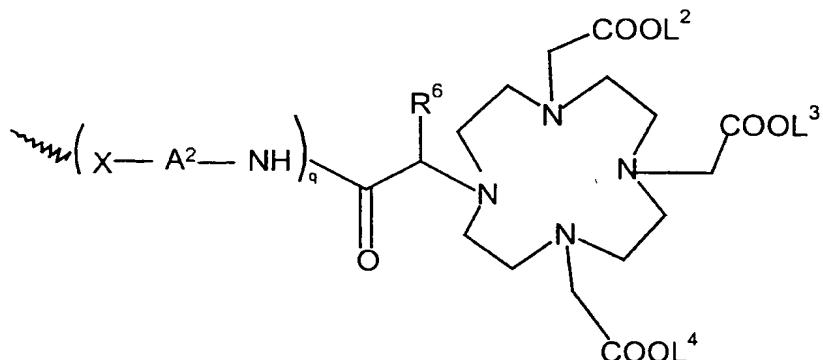
Z eine Gruppe -OL ist, mit L in der Bedeutung eines anorganischen oder organischen Kations oder eines C₁-C₄-Alkylrestes ist,

15 A eine Phenoxy- oder eine durch ein oder mehrere Sauerstoffatome unterbrochene C₁-C₁₂-Alkylen- oder C₇-C₁₂ Aralkylengruppe bedeutet, o und q unabhängig voneinander die Ziffern 0 oder 1 bedeuten und

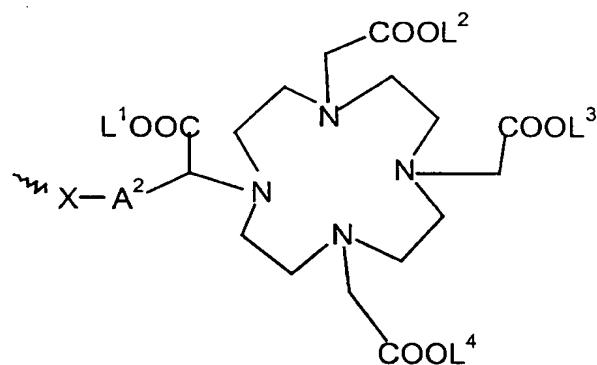
D ein Wasserstoffatom oder eine Gruppe -CO-A-(COOL)₀-(H)_m bedeutet, mit m gleich 0 oder 1 und unter der Maßgabe, daß die Summe aus m und o gleich 1 ist,

R³ für eine Gruppe -(C=Q)(NR⁴)₀-(A)_q-(NR⁵)-K steht,
 worin Q für ein Sauerstoffatom oder für zwei Wasserstoffatome steht,
 R⁴ eine Gruppe -(A)_q-H bedeutet und
 5 K einen Komplexbildner der allgemeinen Formel (IIc), (IId) oder (IIe)
 bedeutet, wobei R⁵ die gleiche Bedeutung wie D hat, mit der Maßgabe,
 daß
 eine direkte Sauerstoff-Stickstoff Bindung nicht zugelassen ist,
 und K für einen Komplexbildner der allgemeinen Formel (IIc), (IId),
 10 (IIe) oder (IIf)





(IIIe),



(IIIf)

worin

q die oben angegebene Bedeutung hat,

A^1 die für A angegebene Bedeutung hat,

5 R^6 für ein Wasserstoffatom, eine geradkettige oder verzweigte C₁-C₇-Alkylgruppe,
eine Phenyl- oder Benzylgruppe,A² für eine Phenyl-, -CH₂-NHCO-CH₂-CH(CH₂COOH)-C₆H₄-β-, -C₆H₄-O-(CH₂)₀₋₅-β-, -C₆H₄-(OCH₂CH₂)₀₋₁-N(CH₂COOH)-CH₂-β10 oder eine gegebenenfalls durch ein oder mehrere Sauerstoffatome,
1 bis 3-NHCO-, 1 bis 3-CONH-gruppen unterbrochene und/oder mit
1 bis 3-(CH₂)₀₋₅COOH-Gruppen substituierte C₁-C₁₂-Alkylen- oder
C₇-C₁₂-Alkylengruppe, wobei β für die Bindungsstelle an X steht,

15 X für eine -CO- oder NHCS-gruppe und

L^1 , L^2 , L^3 und L^4 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom oder ein Metallionenäquivalent eines Elements der oben genannten Ordnungszahl steht, unter den Maßgaben, daß mindestens zwei dieser Substituenten für Metallionenäquivalente stehen, und daß zum Ausgleich gegebenenfalls vorhandener Ladungen im Metalloporphyrin weitere Anionen vorhanden sind und worin freie, nicht zur Komplexierung benötigte Carbonsäuregruppen auch als Salze mit physiologisch verträglich anorganischen und/oder organischen Kationen oder als Ester oder als Amide vorliegen können.

5 6. Komplexverbindungen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß A^2 für eine $-CH_2-$, $-(CH_2)_2-$, $-CH_2OC_6H_4-\beta$, $-CH_2OCH_2-$, $-C_6H_4-$, $-C_6H_4-OCH_2-\beta$, $-C_6H_4-$
OCH₂CH₂-N(CH₂COOH)-CH₂- β , CH₂-NHCO-CH₂-CH(CH₂COOH) -C₆H₄- β -gruppe steht, wobei β für die Bindungsstelle an X steht.

10 7. Komplex-Verbindungen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß X für eine CO-Gruppe steht.

15 8. Komplex-Verbindungen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß R⁶ für ein Wasserstoffatom oder eine Methylgruppe steht.

20 9. Porphyrin-Komplex-Verbindungen gemäß Formel I von Anspruch 1, nämlich {mu-[{16, 16'-[Chloromangan(III)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}digadolinato(2-),-Dinatrium,

25 {mu-[{16, 16'-[Chloroeisen(III)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-),-Dinatrium,

{mu-[{16, 16'-[Kupfer(II)-7, 12-diethyl-3, 8, 13, 17-tetramethylporphyrin-2, 18-diyl]-bis[3, 6, 9-tris(carboxymethyl)-11, 14-dioxo-3, 6, 9, 12, 13-pentaazahexadecanoato]}(8-)]}-digadolinato(2-),-Dinatrium

30



Abb. 1a: Präkontrast

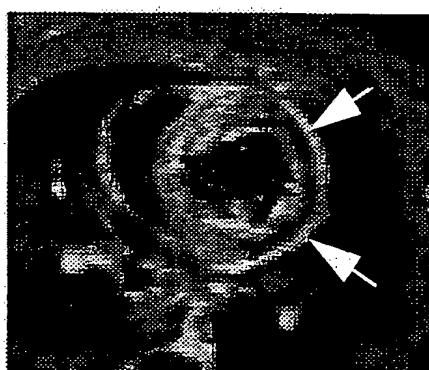


Abb. 1b: ca. 0.5 min p. i.

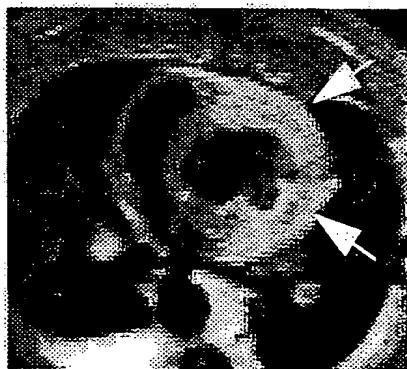


Abb. 1c: ca. 2.5 h p. i.

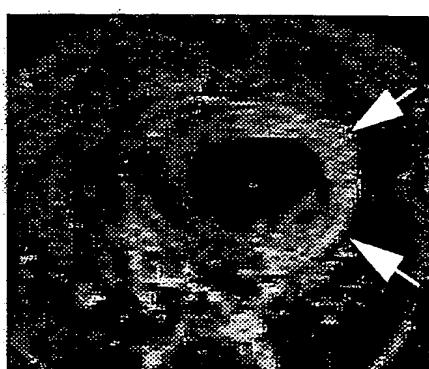


Abb. 1d: ca. 24 h p. i.

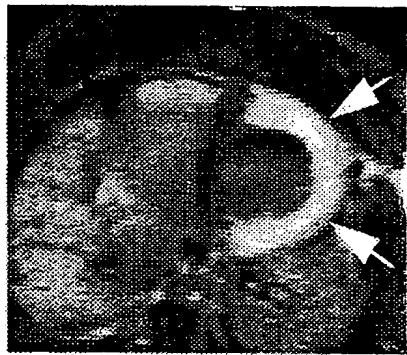


Abb. 1e: post mortem MRI



Abb. 2a: Präkontrast



Abb. 2b: ca. 0.5 min p. i.



Abb. 2c: ca. 2.5 h p. i.

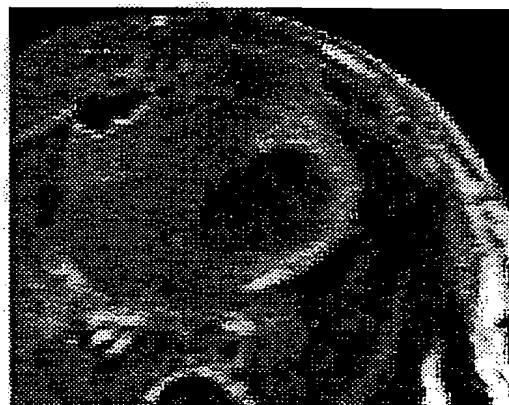


Abb. 2d: ca. 24 h p. i. (postmortem MRI)



Abb. 3a: Präkontrast



Abb. 3b: ca. 0.5 min p. i.

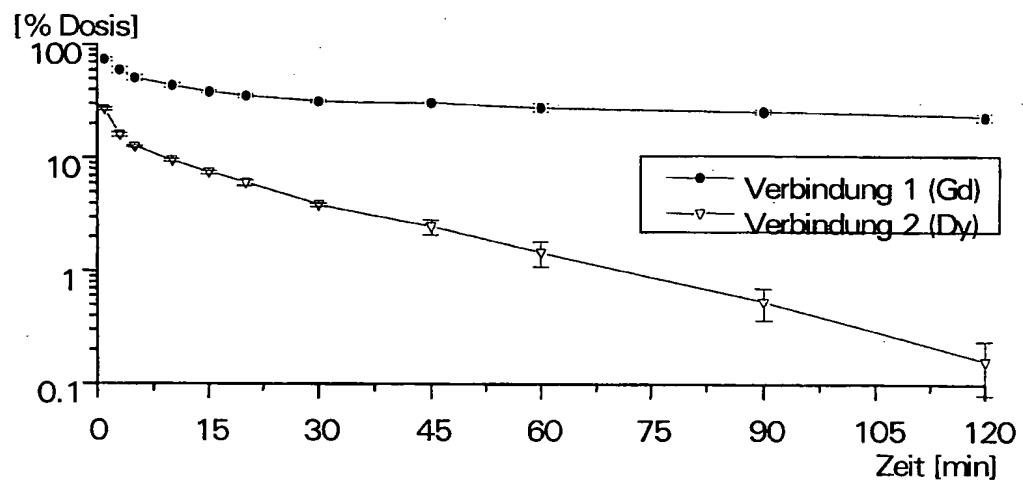


Abb. 3c: ca. 2.5 h p. i.



Abb. 3d: ca. 24 h p. i. (post mortem MRI)

Abb.4: Blutspiegel (in % der Dosis) von Verbindung 1 (Gd) im Vergleich zu Verbindung 2 (Dy) in Ratten (n=3).



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte .onal Application No
PCT/EP 99/05522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D487/22 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 42 32 925 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST) 31 March 1994 (1994-03-31) cited in the application the whole document ---	1-8
X	EP 0 355 041 A (SCHERING AG) 21 February 1990 (1990-02-21) page 3, line 11 -page 13, line 10 page 13, line 35; claims 1-11 ---	1-8
Y	US 5 284 647 A (NIEDBALLA ULRICH ET AL) 8 February 1994 (1994-02-08) column 2, line 44 -column 8, line 16 column 17, line 38,39 ---	1-9
E	WO 99 43317 A (SCHERING AG) 2 September 1999 (1999-09-02) the whole document ---	1-9
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 1999

Date of mailing of the international search report

21/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Engl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No
PCT/EP 99/05522

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 31219 A (LEUVEN K U RES & DEV ; MARCHAL GUY JACQUES FELIX (BE); NI YICHENG () 23 November 1995 (1995-11-23) cited in the application the whole document -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05522

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 4232925	A 31-03-1994	WO 9407894 A		14-04-1994
		EP 0662972 A		19-07-1995
		JP 8504399 T		14-05-1996
		NO 951166 A		27-03-1995
		US 5849259 A		15-12-1998
		ZA 9307194 A		21-04-1994
EP 0355041	A 21-02-1990	DE 3827940 A		01-03-1990
		AT 128138 T		15-10-1995
		AU 622470 B		09-04-1992
		AU 3957089 A		15-02-1990
		DE 58909444 D		26-10-1995
		DK 395289 A		14-02-1990
		ES 2077577 T		01-12-1995
		GR 3017586 T		31-12-1995
		IE 70229 B		13-11-1996
		JP 2160789 A		20-06-1990
		NO 893245 A, B,		14-02-1990
		NZ 230288 A		25-06-1992
		PT 91422 A, B		08-03-1990
		US 5275801 A		04-01-1994
US 5284647	A 08-02-1994	DE 3809671 A		28-09-1989
		AT 148121 T		15-02-1997
		AU 3148589 A		21-09-1989
		DE 58909767 D		06-03-1997
		DK 132889 A		19-09-1989
		EP 0336879 A		11-10-1989
		ES 2099697 T		01-06-1997
		GR 3022868 T		30-06-1997
		JP 1275583 A		06-11-1989
		NO 891187 A		19-09-1989
		NZ 228405 A		28-05-1991
		PT 90033 A, B		10-11-1989
WO 9943317	A 02-09-1999	DE 19824653 A		26-08-1999
WO 9531219	A 23-11-1995	CA 2189967 A		23-11-1995
		EP 0758907 A		26-02-1997
		JP 10500122 T		06-01-1998
		NO 964780 A		11-11-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/05522

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07D487/22 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 42 32 925 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST) 31. März 1994 (1994-03-31) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-8
X	EP 0 355 041 A (SCHERING AG) 21. Februar 1990 (1990-02-21) Seite 3, Zeile 11 -Seite 13, Zeile 10 Seite 13, Zeile 35; Ansprüche 1-11 ---	1-8
Y	US 5 284 647 A (NIEDBALLA ULRICH ET AL) 8. Februar 1994 (1994-02-08) Spalte 2, Zeile 44 -Spalte 8, Zeile 16 Spalte 17, Zeile 38,39 ---	1-9
E	WO 99 43317 A (SCHERING AG) 2. September 1999 (1999-09-02) das ganze Dokument ---	1-9
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14. Dezember 1999

21/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Engl, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/05522

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 31219 A (LEUVEN K U RES & DEV ;MARCHAL GUY JACQUES FELIX (BE); NI YICHENG () 23. November 1995 (1995-11-23) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05522

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4232925 A	31-03-1994	WO 9407894 A		14-04-1994
		EP 0662972 A		19-07-1995
		JP 8504399 T		14-05-1996
		NO 951166 A		27-03-1995
		US 5849259 A		15-12-1998
		ZA 9307194 A		21-04-1994
EP 0355041 A	21-02-1990	DE 3827940 A		01-03-1990
		AT 128138 T		15-10-1995
		AU 622470 B		09-04-1992
		AU 3957089 A		15-02-1990
		DE 58909444 D		26-10-1995
		DK 395289 A		14-02-1990
		ES 2077577 T		01-12-1995
		GR 3017586 T		31-12-1995
		IE 70229 B		13-11-1996
		JP 2160789 A		20-06-1990
		NO 893245 A, B,		14-02-1990
		NZ 230288 A		25-06-1992
		PT 91422 A, B		08-03-1990
		US 5275801 A		04-01-1994
US 5284647 A	08-02-1994	DE 3809671 A		28-09-1989
		AT 148121 T		15-02-1997
		AU 3148589 A		21-09-1989
		DE 58909767 D		06-03-1997
		DK 132889 A		19-09-1989
		EP 0336879 A		11-10-1989
		ES 2099697 T		01-06-1997
		GR 3022868 T		30-06-1997
		JP 1275583 A		06-11-1989
		NO 891187 A		19-09-1989
		NZ 228405 A		28-05-1991
		PT 90033 A, B		10-11-1989
WO 9943317 A	02-09-1999	DE 19824653 A		26-08-1999
WO 9531219 A	23-11-1995	CA 2189967 A		23-11-1995
		EP 0758907 A		26-02-1997
		JP 10500122 T		06-01-1998
		NO 964780 A		11-11-1996